



TITLE:

神経回路トレーシングのための遺
伝学的手法の開発(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

坂口, 理智

CITATION:

坂口, 理智. 神経回路トレーシングのための遺伝学的手法の開発. 京都大学, 2019, 博士(生命科学)

ISSUE DATE:

2019-03-25

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k21926>

RIGHT:

(続紙 1)

京都大学	博士（生命科学）	氏名	坂口 理智
論文題目	神経回路トレーシングのための遺伝学的手法の開発		
(論文内容の要旨)			
<p>神経細胞のネットワークの接続様式の全体像（コネクトーム）を明らかにすることは脳機能の神経回路基盤を理解する上で重要である。近年、光学顕微鏡を用いるコネクトーム解析は、蛍光プローブや透明化標本作製技術、更に顕微鏡自体の改良に伴い、シナプスレベルから全脳スケールまで可能になった。こうしたことから、今後コネクトームを解析するための主要なアプローチとなることが期待されている。</p> <p>光学顕微鏡を用いたコネクトーム解析においては、単色標識だと膨大な数の神経細胞が微細な神経突起を伸ばして交差しているため、個々の神経細胞を見分けることが困難であるという問題があった。これを克服するには、①広範囲の神経細胞を多色標識して観察する方法、②局所回路のみを標識する方法があげられる。本研究では、①と②のそれぞれについて、新たな遺伝学的手法の開発に取り組んだ。</p> <p>まず、①の方法、多色標識法に関しては、既にBrainbowと呼ばれる手法が報告されている。これは、Cre-loxPシステムによって、3色の蛍光タンパク質を確率的に発現させ、更に3色の蛍光タンパク質を組み合わせることで中間色を作り出すという手法である。3種類の蛍光タンパク質の組み合わせによって、数10種類もの染め分けが可能になるとされている。しかしながら、このBrainbow法は蛍光輝度が弱く、神経突起の解析には不十分であるという弱点があった。本研究では蛍光タンパク質の発現にTet-offシステムを用いることで輝度を向上し、更にプラスミドやウイルスベクターによる遺伝子導入法に最適化した新たな多色標識法Tetbowの開発を行った。多色標識において重要なのは各蛍光タンパク質遺伝子の1細胞あたりのコピー数である。本研究では最適なコピー数についてシミュレーションを行って検討したところ、多様な色相をもつ多色標識をサンプル中で実現するには、細胞に導入される蛍光タンパク質発現カセットの平均コピー数を過剰に増やしてしまうと色相のバラエティがなくなってしまうので、平均コピー数を比較的少数にとどめておく必要があり、1細胞、1色あたり平均2コピー程度のプラスミドが導入されると多様な色相を作り出せると結論した。更に実験的にも最適な条件を決定した。Tetbowと透明化法を組み合わせることで、神経細胞の形態を3次元的に異なる色を用いて観察できることがわかった。更に、ケミカルタグを用いた染色にも拡張することに成功した。また、このTetbowを用いることで、従来は困難であった長距離投射の解析も可能となった。嗅球の僧房細胞に対して、アデノ随伴ウイルスでTetbowを導入し、嗅皮質まで数ミリメートルにわたって伸びている複数の僧帽細胞の軸索を一つ一つ区別してトレーシングすることにも成功した。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

神経科学の分野において、神経ネットワークの構成と接続様式は機能を理解する上でも基本的な情報である。従って、脳内の莫大な数の神経細胞からなるネットワークを一つ一つ区別してトレースする方法が透明化技術と並行して開発されてきた。なかでも、組換え酵素のターゲット配列であるloxPを挟んで複数の蛍光タンパク遺伝子を並列に並べ、組み換え酵素Creを発現させることにより、神経細胞ごとに異なる蛍光タンパクを発現し、多数の神経細胞を同時に標識、トレースすることができるBrainbowと呼ばれるシステムが最もよく知られている。これはトランスジェニックマウスを用いる最初の報告に続き、electroporationで遺伝子を導入する方法も開発されているが、前者は蛍光強度が弱く、後者は細胞内小器官のマーカーなどを用いているので、共にaxonを終末まで正確に追跡するにはそれぞれ難点があり、ニューロン群の投射を含めたネットワークを正確に知るためには新たな方法の開発が期待されていた。申請者は、これらの問題を克服するための方法として、Tet-offシステムで3種類の異なる蛍光タンパク質遺伝子を活性化する独立なベクター系をプラスミドやウイルスベクターを用いて導入し、局所的に神経細胞群をラベルする方法Tetbowシステムを開発した。Tet-off システムをプロモーターとして用いることで、蛍光タンパク遺伝子の発現を増幅でき、十分な蛍光強度を確保することができた。また、Electroporation法によりひとつの細胞に導入される3色の蛍光タンパク質遺伝子のコピー数がポアソン分布となることを利用し、周到的予備的解析とシミュレーションを行い、識別可能な色相の限界についても検討している。さらに、同方法がミリメートルレベルの距離の神経軸索をラベルし、区別できることを大脳皮質、嗅覚神経系で示した。

本研究のアプローチは基本的な分子生物学的、生物工学的な手法とシミュレーションを用いながらも、現代神経科学の要請に応えるような新しい技術を提供したという点で、独創的なものとして評価できる。さらに、イメージング技術と神経回路の定量解析においてこれまでの方法に比べて、より完成度が高く、容易に利用できる利点を併せ持っている点で、成熟度が高い方法と言える。論文は論理的に構成され、実験手法の着想の経緯、手法の詳細、結果とその解釈が証拠に基づき記載され、本研究の結果を踏まえた考察や将来の展望が妥当性をもって言及されている。

以上のように、本論文は生命科学に関する高度で幅広い学識、専攻分野における優れた研究能力、そして生命科学の理解・発展に寄与する新しい発見および概念が示されており、論理的かつ一貫性をもって記述されている。よって博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認めた。2019年2月14日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。(ただし、学位規則第8条の規定により、猶予期間は学位授与日から3ヶ月以内を記入すること。)

要旨公開可能日： 年 月 日